



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS**

JOAO MATHEUS DOS SANTOS BRANDÃO

**EFEITOS DA GESTAÇÃO E AMAMENTAÇÃO EM MÃES
ESQUISTOSSOMÓTICAS EM CAMUNDONGOS DESCENDENTES
PORTADORES DE CARCINOMA DE EHRLICH: Avaliação da expressão de
genes pró e anti-inflamatórios**

RECIFE

2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS BACHARELADO

JOÃO MATHEUS DOS SANTOS BRANDÃO

EFEITOS DA GESTAÇÃO E AMAMENTAÇÃO EM MÃES
ESQUISTOSSOMÓTICAS EM CAMUNDONGOS DESCENDENTES
PORTADORES DE CARCINOMA DE EHRLICH: Avaliação da expressão de
genes pró e anti-inflamatórios

TCC apresentado ao Curso de Ciências
Biológicas Bacharelado da Universidade
Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico
da Recife, como requisito para a obtenção do
título de Bacharel em Biologia.

Orientador(a): Valdênia Maria
Oliveira de Souza.

RECIFE

2025

JOÃO MATHEUS DOS SANTOS BRANDÃO

**EFEITOS DA GESTAÇÃO E AMAMENTAÇÃO EM MÃES
ESQUISTOSSOMÓTICAS EM CAMUNDONGOS DESCENDENTES
PORTADORES DE CARCINOMA DE EHRLICH: Avaliação da expressão de
genes pró e anti-inflamatórios**

TCC apresentado ao Curso de Ciência
Biológicas Bacharelado da Universidade
Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico
da Recife, como requisito para a obtenção do
título de Bacharel em Biologia.

Aprovado em: 29/07/2025

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr^a. Valdênia Maria Oliveira de Souza
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a. Cássia Giselle de Oliveira Nóbrega (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr^a Gabriela Calixto Ribeiro de Holanda (Examinador Externo)
Universidade de Nagasaki - Japão

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Brandão, João Matheus dos Santos.

EFEITOS DA GESTAÇÃO E AMAMENTAÇÃO EM MÃES
ESQUISTOSSOMÓTICAS EM CAMUNDONGOS DESCENDENTES
PORTADORES DE CARCINOMA DE EHRLICH: Avaliação da expressão de
genes pró e anti-inflamatórios / João Matheus dos Santos Brandão. - Recife, 2025.
26p : il.

Orientador(a): Valdênia Maria Oliveira de Souza
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas - Bacharelado, 2025.
Inclui referências, apêndices.

1. Imunologia . 2. Parasitologia. 3. Imunoparasitologia. 4. Câncer. 5.
Inflamação. 6. Amamentação. I. Souza, Valdênia Maria Oliveira de . (Orientação).
II. Título.

570 CDD (22.ed.)

AGRADECIMENTOS

Agradeço infinitamente a Deus e Nossa Senhora pelo dom da vida, por me conceder sabedoria e discernimento para levantar e seguir em frente nos momentos em que mais pensei em desistir.

Aos meus pais Danielle e João e meu irmão Gabriel, por me mostrarem o verdadeiro sentido do amor, por todo carinho e dedicação, por todos os domingos que com um abraço apertado e um “Deus te abençoe” me deixaram sair de casa em busca dos meus sonhos, por desde pequeno me apoiarem em tudo que me propus fazer, por sempre me fazerem acreditar que posso alcançar tudo que um dia eu almejar, por saber que independentemente do quão longe eu for sempre poderei voltar pra casa e terei vocês de braços abertos prontos para me receber, nada que eu fale será capaz de sintetizar e expressar o amor e a gratidão que tenho por vocês.

À minha namorada, Maria Júlia, pela parceria no dia a dia, finalizar esta etapa se tornou muito mais fácil depois que você entrou na minha vida, por me apoiar e me suportar até nos momentos em que nem eu mesmo me suportava, por me fazer acreditar que um novo dia iria chegar e que Deus sempre irá preparar algo incrível, por todas as risadas, viagens e momentos alegres que vivemos durante esse final de graduação, com toda certeza foram de extrema importância no processo de levar com mais leveza essa reta final.

À minha orientadora e Prof.^a Valdênia Souza, por todos os ensinamentos que me foram passados ao longo de 4 anos de iniciação científica, por todas as oportunidades que me foram dadas, pelos puxões de orelha, desafios propostos e todos os momentos de conversa e por me ensinar que independentemente de qualquer coisa, no final tudo dá certo. Serei eternamente grato, hoje posso falar que minha vontade de continuar no meio acadêmico tem uma grande influência sua, graças aos seus ensinamentos hoje mais que nunca a chama por ser um cientista e fazer ciência de qualidade está muito mais acesa em meu coração.

Aos meus amigos do setor de Imunologia e demais setores do ILika: Jenyffer, Raul, Edmilson, Mariana, Franciele, Clarice, Fabrício Souto, Patrícia, Cássia, Ângela, Brasiliano e tantos outros que passaram pela minha vida durante esses anos, vocês foram parte primordial na minha formação, poder contar com vocês em momentos de dúvida sobre experimentos, dificuldades em executar algum protocolo ou até mesmo rir nos momentos que parecia que nada iria dar certo durante os experimentos. Dividir essa fase da minha vida com vocês foi incrível.

Por fim, agradeço a cada desafio enfrentado ao longo deste processo — por mais árduo e doloroso que tenha sido, ele foi o alicerce da minha superação. Foi nessa trajetória intensa que descobri, com paixão, a beleza da ciência. Cada obstáculo superado moldou não só meu conhecimento, mas também minha coragem e amor pelo que faço. Hoje, olho para trás com gratidão e para o futuro com esperança e entusiasmo por tudo o que ainda posso contribuir por meio da ciência."

*“Fazer ciência é insistir em perguntas incômodas,
tropeçar em hipóteses elegantes e, ainda
assim, continuar – porque a dúvida, mais
do que a certeza, é o que nos move”
(Anderson dos Santos Ramos)*

RESUMO

A esquistossomose materna pode modular a imunidade da prole frente a antígenos heterólogos. Neste contexto, este estudo, investigou os efeitos da gestação e da amamentação por mães esquistossomóticas na resposta imunológica antitumoral de camundongos adultos, com ênfase na expressão de genes pró e anti-inflamatórios. Para isto, camundongos fêmeas foram infectadas com *Schistosoma mansoni* (20 cercárias) e acasaladas no 60º dia de infecção. Após o nascimento, parte dos filhotes tiveram suas mães trocadas, formando os grupos experimentais AI-CE (amamentados por mães infectadas), MI-CE (nascidos de mães infectadas, amamentados por mães não infectadas), outra parte foi amamentada em suas próprias mães infectadas e nas não infectadas, MIAI-CE e CONTROLE-CE, respectivamente. Quando adultos, foi implantado o carcinoma de Ehrlich (sub-axilar). Avaliaram-se peso corporal, taxa de sobrevivência, crescimento tumoral e expressão gênica das moléculas IL-6, TNF- α , IL-35, TGF- β , PD-L1, FIZZ e ARG em esplenócitos cultivados com ou sem mitógeno. Comparado ao CONTROLE-CE, o grupo AI-CE apresentou menor peso corporal, maior sobrevivência (86%) e aumento basal de IL-6, TNF- α , PD-L1 e FIZZ, mas não sob ativação mitogênica. Os grupos MI-CE e MIAI-CE exibiram maior expressão de TGF- β e IL-35. A expressão de PD-L1 e ARG foi maior no grupo CONTROLE-CE e menor nos grupos experimentais. Então, os dados indicam que a amamentação em mães esquistossomóticas pode melhorar a sobrevivência dos descendentes, por diminuir mecanismos deletérios IL-6- e TNF- α -dependentes, sob ativação celular, enquanto a gestação induz citocinas imunossupressoras associada à progressão tumoral.

Palavras-Chaves: Esquistossomose. Amamentação. Carcinoma de Ehrlich.

ABSTRACT

Maternal schistosomiasis can modulate offspring immunity in response to heterologous antigens. In this context, this study investigated the effects of pregnancy and breastfeeding by *Schistosoma mansoni*-infected mothers on the antitumor immune response of adult mice, with an emphasis on the expression of pro- and anti-inflammatory genes. For this purpose, female mice were infected with *S. mansoni* (20 cercariae) and mated on the 60th day post-infection. After birth, some of the pups were cross-fostered, forming the experimental groups AI-CE (nursed by infected mothers) and MI-CE (born to infected mothers, nursed by uninfected mothers). Another set of pups were nursed by their respective infected or uninfected mothers, forming the MIAI-CE and CONTROL-CE groups, respectively. In adulthood, the Ehrlich carcinoma was implanted (sub-axillary). Body weight, survival rate, tumor growth, and gene expression of IL-6, TNF- α , IL-35, TGF- β , PD-L1, FIZZ, and ARG in splenocytes cultured with or without mitogen. Compared to the CONTROL-CE group, AI-CE mice showed lower body weight, higher survival (86%), and increased basal expression of IL-6, TNF- α , PD-L1, and FIZZ, though not under mitogenic stimulation. The MI-CE and MIAI-CE groups exhibited increased expression of TGF- β and IL-35. PD-L1 and ARG expression were higher in the CONTROL-CE group and lower in the experimental groups. Altogether, these findings suggest that breastfeeding by schistosomotic mothers may improve offspring survival by downregulating deleterious IL-6- and TNF- α -dependent mechanisms under cellular activation, whereas gestation promotes the induction of immunosuppressive cytokines associated with tumor progression.

Keywords: Schistosomiasis. Breastfeeding. Ehrlich Carcinoma.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. METODOLOGIA.....	12
2.1 Infecção materna, amamentação adotiva e formação de grupos de estudo.....	12
2.2 Implantação tumoral, Peso corpóreo e tumoral.....	13
2.3 Cultura primária de células esplênicas de camundongos.....	13
2.4 Análise por PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	13
3. RESULTADOS.....	15
4. DISCUSSÃO.....	20
5. CONCLUSÃO.....	23
6. REFERÊNCIAS.....	24
7. ANEXO A - Normas de publicação da revista.....	26

1. INTRODUÇÃO

A infecção por *Schistosoma mansoni* permanece um relevante problema de saúde global, com mais de 240 milhões de pessoas afetadas, especialmente em regiões tropicais subdesenvolvidas (Dutra., 2024). No contexto perinatal, a gestação em mães esquistossomóticas tem sido associada a alterações imunológicas duradouras na prole. Evidências experimentais demonstram que a exposição intrauterina aos antígenos/anticorpos do *S. mansoni* pode induzir um estado de imunossupressão, marcado pela expansão de linfócitos B reguladores (Bregs) e aumento na produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β (Silva et al., 2021). Por outro lado, a amamentação por mães infectadas melhorou a apresentação antigênica por células dendríticas e aumento na produção de anticorpos específicos (Santos, et al 2010 e 2016). Holanda., 2020 demonstrou que a amamentação por mães esquistossomóticas induziu expressão de múltiplas HDACs (HDAC1, 2, 6, 7, 10 e Sirts 2, 5, 6, 7) nos descendentes adultos, correlacionando-se com resposta imune anti-inflamatória, sobretudo via produção de IL-10 por macrófagos e B-cells. Em contraste, a gestação aumentou apenas a expressão de HDAC9, associada ao aumento de linfócitos CD4⁺ IL-10⁺, sem favorecer a frequência de Tregs. Assim, a amamentação e a gestação modulam diferencialmente a epigenética e a resposta imunológica dos descendentes, com a amamentação exercendo efeito mais amplo na regulação inflamatória. A infecção por *Schistosoma mansoni* altera o perfil proteômico do leite materno, com a presença de proteínas associadas à modulação imune, metabolismo celular e degranulação de neutrófilos. Essas alterações sugerem que o leite de mães infectadas pode influenciar o desenvolvimento imunológico da prole, promovendo um equilíbrio entre estímulo imunológico e mecanismos reguladores, o que reforça seu papel como mediador ativo da programação imune pós-natal (Holanda 2020. Cortés-Selva et al., 2021)

A inflamação crônica constitui um fator determinante na carcinogênese, estabelecendo um microambiente propício à iniciação, promoção e progressão tumoral. Evidências demonstram que o recrutamento persistente de células imunes (neutrófilos, macrófagos e linfócitos) e a liberação contínua de mediadores pró-inflamatórios (IL-1 β , IL-6, TNF- α e COX-2) induzem dano ao DNA, ativação de oncogenes e inibição de genes supressores tumorais, promovendo transformação maligna (Grivennikov et al., 2010). Além disso, a polarização de macrófagos para um fenótipo M2, caracterizado pela expressão de Arginase-1, Fizz1 e IL-10, suprime a resposta imune antitumoral e favorece angiogênese, invasão e metástase (Boutillier et al., 2022). Em contextos como hepatocarcinoma e câncer colorretal, a

inflamação crônica associada a infecções (HBV, HCV) ou doenças inflamatórias intestinais representa um fator de risco bem estabelecido (Min Y et al., 2023). Assim, a compreensão dos mecanismos inflamatórios envolvidos na carcinogênese oferece perspectivas para estratégias terapêuticas inovadoras, incluindo imunomodulação e inibição de vias pró-inflamatórias.

Em paralelo, pesquisas utilizando o modelo de carcinoma de Ehrlich têm contribuído significativamente para o entendimento dos mecanismos de escape tumoral e modulação da resposta imune. Esse modelo, amplamente utilizado em oncologia experimental, permite estudar a interação entre células tumorais e o microambiente imunológico, destacando o papel de *checkpoints* imunes e a regulação por citocinas imunossupressoras (Eissa et al., 2024). No que diz respeito a genes e citocinas, destacamos as seguintes: IL-35 que é produzida principalmente por células Bregs e Tregs, suprime a proliferação de linfócitos Th1 e Th17 via receptor IL-12R β 2/gp130, promovendo tolerância imunológica (Wang et al., 2014). O TNF- α , citocina pró-inflamatória com papel dual, promovendo necroptose em células tumorais via ativação de caspases, mas também contribuindo para a proliferação tumoral em ambientes de inflamação crônica (Sukocheva et al., 2024). O PD-L1, molécula *checkpoint* expressa em células tumorais e mieloides, que ao se ligar a PD-1 em linfócitos T, inibe a ativação das quinases ZAP70 e PKC θ nestas células, suprimindo a resposta citotóxica CD8⁺ (Guo Z et al., 2024). O TGF- β , citocina imunossupressora que induz a diferenciação de Tregs Foxp3⁺ e estimula a deposição de matriz extracelular, contribuindo para a fibrose (Chen et al., 2024). ARG1, enzima expressa por macrófagos M2 que metaboliza L-arginina em óxido nítrico, levando à supressão da proliferação de linfócitos T e promoção da reparação tecidual (Pesce., 2009). Fizz1 (RELM- α) e Arginase-1 (Arg1) são moléculas chave na imunossupressão e progressão tumoral, principalmente através da ativação de macrófagos M2 e células mieloides supressoras (MDSCs) no microambiente tumoral. Fizz1 promove angiogênese, fibrose e supressão da resposta imune, enquanto Arg1 esgota L-arginina, inibindo a proliferação de linfócitos T e favorecendo a sobrevivência das células tumorais.

Diante disso, o presente estudo teve como objetivo verificar nos descendentes adultos nascidos e/ou amamentados em mães esquistossomóticas a progressão do tumor e a expressão gênica de moléculas com caráter pró e anti-inflamatórios. Então, foram comparados o peso do animal e tamanho do Carcinoma de Ehrlich de descendentes de mães esquistossomóticas e não esquistossomóticas, bem como a expressão gênica de IL-6, TNF- α , IL-35, TGF- β , PD-L1, Arg e Fizz em leucócitos esplênicos cultivados sem e sob ativação celular.

2. METODOLOGIA

2.1 Infecção materna, amamentação adotiva e formação de grupos de estudo

Camundongos fêmeas *Swiss Webster* de quatro semanas foram infectadas, subcutaneamente, com 20 cercárias de *S. mansoni* (SLM). Após 45 dias, a infecção foi confirmada usando o método Kato-Katz. Nos 60 dias pós-infecção, as fêmeas foram colocadas em gaiolas com machos a uma proporção de 1:1. O mesmo procedimento foi realizado em fêmeas não-infectadas. Imediatamente após o nascimento, parte dos camundongos recém-nascidos de mães infectadas com *S. mansoni* ou não infectadas foram trocados (amamentação adotiva). Foram formados os seguintes grupos (n = 10): Animais nascidos de mães infectadas foram amamentados por mães não infectadas (grupo de mães infectadas - MI); animais de mães não infectadas são amamentados por mães infectadas (grupo amamentado por infectada) - AI. Os camundongos que nasceram e foram amamentados por mães esquistossomóticas formaram o grupo de mães infectadas e amamentadas em infectadas - MIAI. Os animais nascidos de fêmeas não infectadas e que foram amamentados pelas suas mães, constituíram o grupo CONTROLE.

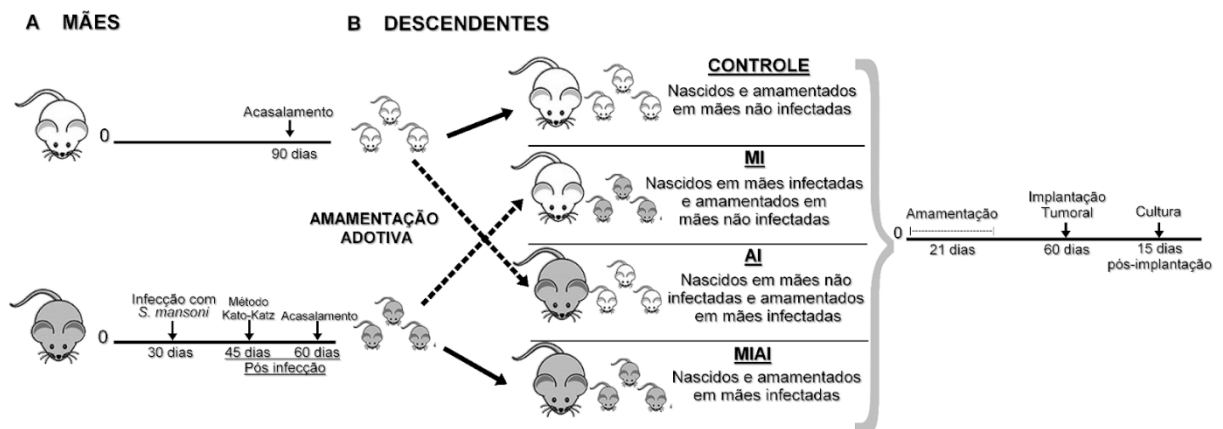


Figura 1: Infecção, parasitológico, regulação do estro, acasalamento e formação dos grupos de estudo

2.2 Implantação tumoral, Peso corpóreo e tumoral

Camundongos com seis semanas de vida foram submetidos à implantação do tumor Carcinoma de Ehrlich por injeção subcutânea na região sub-axilar em 25×10^6 células/mL, as células tumorais foram removidas de animais doadores por aspiração do líquido ascítico e introduzidas nos animais receptores (SILVA et al., 2016). O peso corpóreo dos animais foi determinado nos dias 0, 8 e 15 pós-implantação, neste último dia os animais foram eutanasiados (deslocamento cervical) e a necropsia foi realizada para remoção dos baços e pesagem dos tumores.

2.3 Cultura primária de células esplênicas de camundongos

As células esplênicas de cada animal foram preparadas a partir da maceração do baço em meio RPMI-1640 suplementado (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e cultivadas com meio de cultura (Basal) ou com concanavalina A (ConA) ($5 \mu\text{g/mL}$), na concentração final de 2×10^7 células/mL (24h) ou 12×10^6 células/mL (72h) em placas de cultura de 48 poços (Corning, Inc., Corning, NY, USA), em 37°C em 5% CO_2 .

2.4 Análise por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

O material celular foi armazenado em RNAlater (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) (7 animais/grupo). O RNA total das células 12×10^6 foi extraído usando TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA complementar (cDNA) foi produzido com o kit QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen, Hilden, Germany). A PCR quantitativa foi realizada utilizando o master mix SYBR Green (Applied Biosystems, Foster City, CA) no 7500 Real Time System (Applied Biosystems). Os resultados foram normalizados com base na expressão gene endógeno β -actina. Os níveis da expressão relativa foram calculados usando a expressão $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. Os primers foram desenhados usando o Primer Designing Tool produzido pelo National Center for Biotechnology Information (NCBI) e o National Institutes of Health (NIH). As sequências utilizadas estão descritas a seguir: IL-6 (NM_010548) Sequência GTCATCGATTTCTCCCCTGTG (5' Forward), ATGGCCTTGTAGACACCTTG (3' reverse); EBI-3 (IL-35) (NM_015766.2), sequência CACTGAAACAGCTCTCGTGG (5' Forward), ATGGCCTTGTAGACACCTTG (3' Reverse); TGF- β 1 (NM_011577.2) sequência

(5' Forward) ATGCTAAAGAGGTCACCCGC, (3' Reverse)
 TGCTTCCCGAATGTCTGACG; ARG1 (NM_007482.3) sequência (5' Forward)
 TCGCCACATGAAAACCATC, (3' Reverse) TTGGGAGGAGAAGGCGTTTG; ARG1
 (NM_007482.3), sequência (5' Forward) TCGCCACATGAAAACCATC, (3' Reverse)
 TTGGGAGGAGAAGGCGTTTG; FIZZ1 (NM_020509) sequência (5'
 Forward) ACTGCCTGTGCTTACTCGTTGA, (3' Reverse)
 TCCACCTCTTCATTCTTAGGACAGT T; β -Actina (NM_007393.5), sequência (5'
 Forward) TTGCTGACAGGATGCAGAAG, (3' Reverse) TGATCCACATCTGCTGGAAG

3. RESULTADOS

Animais amamentados em mães esquistossomóticas apresentaram um menor peso corpóreo e melhor taxa de sobrevivência.

Ao realizar a análise do peso corpóreo dos animais dos diferentes grupos experimentais (Tabela 1), observou-se que no 8º dia pós-implantação o grupo AI-CE apresentou um ganho de peso significativamente inferior em comparação ao CONTROLE-CE que se manteve no 15º dia, mas sem diferença estatística significativa. Quando comparados ao grupo CONTROLE-CE, os animais pertencentes ao grupo AI-CE exibiram uma taxa de sobrevivência superior (86%). Não foram evidenciadas diferenças para os grupos MIAI-CE e MI-CE em relação ao CONTROLE-CE. No 15º dia, os tumores foram retirados e submetidos à mensuração do seu peso. Não foi verificada diferença estatística significativa entre os grupos experimentais e o grupo CONTROLE-CE, embora possa ser observada discreta diminuição no peso tumoral do grupo AI.

Tabela 1 - Análise de sobrevida, peso tumoral e peso corpóreo em descendentes de mães não infectadas e infectadas com *S. mansoni*

Grupo^a	P8-P0^b (g)	P15-P0 (g)	Taxa de sobrevida (%)^c	Peso tumoral (g)^d
CONTROLE-CE	5.000± 0.36	9.000 ± 0.60	47	5.405± 0.43
AI-CE	4.500± 0.31*	7.500 ± 0.48	86*	4.952±0.40
MI-CE	5.000 ± 0.31	8.000 ± 0.77	60	5.661± 0.39
MIAI-CE	6.000± 0.48	8.000 ± 0.46	53	5.735±0.53

a) Camundongos adultos *Swiss webster* amamentados (AI-CE), nascidos (MI-CE) ou nascidos e amamentados (MIAI-CE) em mães infectadas com *S. mansoni*, nascidos e amamentados em mães não infectadas (CONTROLE-CE), quando submetidos à implantação do Carcinoma de Ehrlich (25×10^6 células/animal), foram acompanhados por 15 dias depois da implantação tumoral; b) mediana $\pm$ desvio padrão (DP) do 8º dia (P8) ou 15º (P15) - peso no dia da implantação (P0); c) taxa de sobrevida, a partir de análises da curva de sobrevida, realizadas ao longo dos 15 dias; d) mediana $\pm$ DP do peso tumoral, análises realizadas no 15º dia após eutanásia e pesagem do tumor. * $p < 0.05$ comparado com o grupo CONTROLE

A amamentação por mães esquistossomóticas não sustenta a expressão de IL-6, TNF e PD-L1 sob ativação, enquanto a gestação levou a maior expressão de IL-35 e TGF- β .

Quanto à expressão de moléculas imunomodulatórias, nossos resultados mostram que no grupo CONTROLE-CE não houve expressão significativa, em resposta ao mitógeno, de IL-6 e TNF- α (Figura 2a e 2b), o mesmo foi observado para os grupos AI-CE, MI-CE e MIAI-CE. Contudo, pôde ser observado maior expressão basal destas citocinas no grupo AI-CE. Com relação à expressão de IL-35 (Figura 2c) e TGF- β (Figura 2d), não houve expressão significativa, em resposta ao mitógeno, no grupo CONTROLE-CE e no AI-CE. Diferentemente, houve mais IL-35 basal no grupo MI-CE e mais TGF, em resposta a ConA, nos grupos MIAI-CE e MI-CE. Para a molécula PD-L1 (Figura 3a), houve expressão maior em resposta ao mitógeno no grupo CONTROLE-CE, que foi significativamente menor nos grupos experimentais. Houve maior expressão basal desta molécula no grupo AI-CE quando comparado ao CONTROLE-CE. Nas figuras 3b e 3c, observamos que houve expressão apenas de ARG e não de FIZZ, em resposta ao mitógeno, e que foi menor nos grupos experimentais. No grupo AI-CE houve expressão maior de Fizz basal em comparação com grupo CONTROLE-CE.

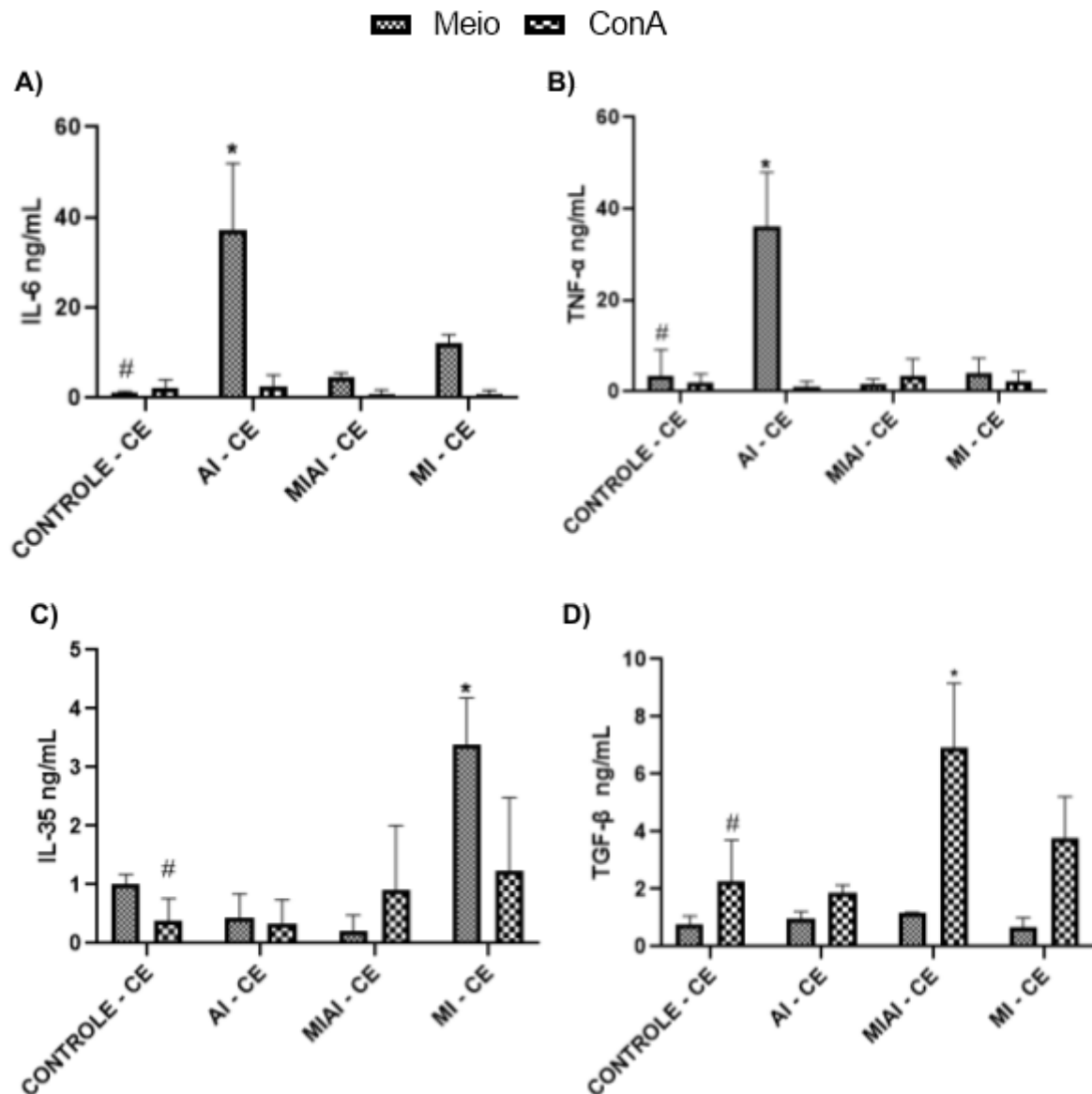


Figura 2- Níveis das citocinas (A) IL-6, (B) TNF- α , (C) IL-35, (D) TGF- β produzidas por células esplênicas de camundongos adultos amamentados (AI-CE), nascidos (MI-CE), ou nascidos e amamentados (MIAI-CE) em mães infectadas com *S. mansoni*, nascidos e amamentados em mães não infectadas (CONTROLE-CE) portadores de Carcinoma de Ehrlich. 12×10^6 células foram cultivadas apenas com meio (basal) ou mitógeno (ConA) ($5 \mu\text{g/mL}$) (72 h). Os resultados representam a mediana $\pm$ erro padrão. *p < 0.05 quando comparado com o grupo CONTROLE-CE. #p < 0.05 quando comparado ao cultivo com MEIO (intragrupo).

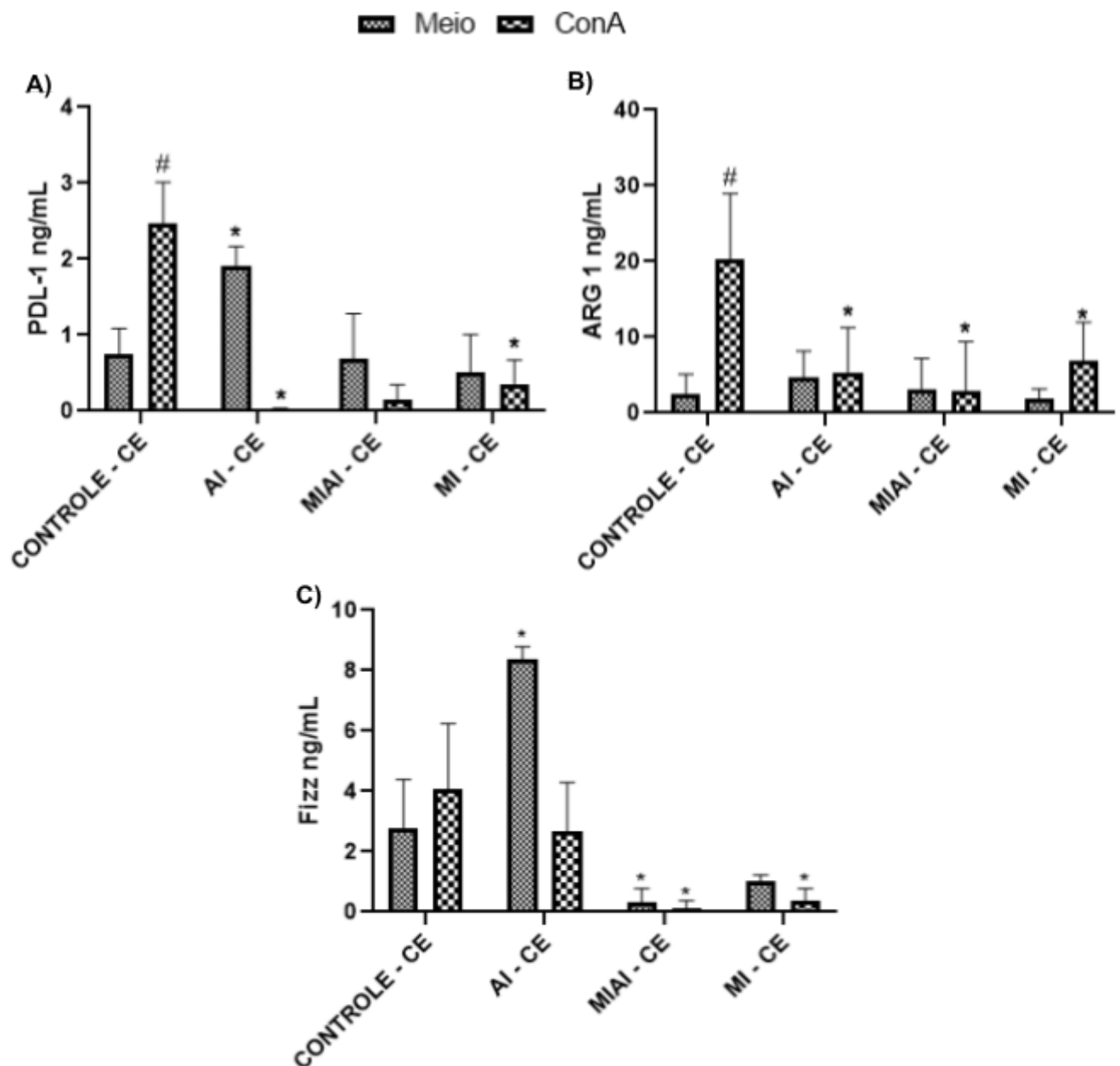


Figura 3 Níveis de (A) PDL-1, (B) Arginase (Arg1) e (C) Fizz produzidas por células esplênicas de camundongos adultos amamentados (AI-CE), nascidos (MI-CE), ou nascidos e amamentados (MIAI-CE) em mães infectadas com *S. mansoni*, nascidos e amamentados em mães não infectadas (CONTROLE-CE) portadores de Carcinoma de Ehrlich. 12×10^6 células foram cultivadas apenas com meio (basal) ou mitógeno (ConA) ($5 \mu\text{g/mL}$), 72 h. Os resultados representam a mediana $\pm$ erro padrão. * $p < 0.05$ quando comparado com o grupo CONTROLE-CE; # $p < 0.05$ quando comparado ao cultivo com MEIO (intragrupo).

1. DISCUSSÃO

Ao avaliar o efeito da amamentação ou gestação em mães esquistossomóticas na resposta imunológica frente ao carcinoma de Ehrlich, o achado mais proeminente foi o aumento significativo na taxa de sobrevivência dos animais amamentados por mães infectadas e maior expressão de IL-35 e TGF nos animais gerados em mães esquistossomóticas. Além disso, a amamentação foi capaz de reverter parcialmente o potencial imunossupressor da gestação nos descendentes por levar a menor produção de IL-35 nos animais MIAI-CE.

Nos animais AI-CE, a sobrevivência do hospedeiro parece estar dissociada do crescimento tumoral (medido pelo peso do tumor) e sugere que os mecanismos protetores induzidos pela amamentação em mães esquistossomóticas podem não estar primariamente ligados à erradicação completa do tumor, mas a melhor capacidade de controlar processos paraneoplásicos deletérios. Entre eles, as síndromes endócrinas (como hipercalcemia e SIADH), os distúrbios hematológicos (anemia, trombozes), a síndrome febril/inflamatória e a caquexia. Esses dois últimos dependem diretamente da liberação de citocinas como IL-6 e TNF- α e seus efeitos agravam o estado clínico do paciente, contribuindo para fraqueza, imunossupressão, desnutrição e pior prognóstico. A caquexia é uma síndrome inflamatória caracterizada por perda de massa muscular e gordura corporal. A IL-6 atua principalmente ativando a via JAK/STAT3, promovendo proteólise muscular, lipólise e inibindo a síntese proteica, além de afetar o apetite por ação no sistema nervoso central (Bonetto A et al., 2012; S. Kir et al., 2024). Já o TNF- α , também conhecido como caquetina, ativa a via NF- κ B nos músculos, estimula a degradação proteica pelo sistema ubiquitina-proteassoma, promove resistência à insulina e reduz a lipogênese (Caldito et al., 2023; Fearon, K et al., 2012). Ambas as citocinas colaboram para um estado de inflamação crônica que perpetua a perda tecidual. Embora tenha havido perda de peso nos animais AI-CE, este fato não pode ser atribuído à caquexia, uma vez que os animais apresentavam parâmetros indicativos de melhor qualidade de vida como pelagem preservada, locomoção adequada e apetite mantido, características que refletem um menor grau de caquexia e corroboram os dados de longevidade. Adicionalmente, não houve aumento da expressão de genes de moléculas imunossupressoras, IL-35, TGF e PD-L1 (Cao, G et al., 2025) e dos genes com ação pró-fibróticas ligados ao pior prognóstico tumoral. Este cenário pode refletir a melhor sobrevivência induzida pelo contato prévio com leite materno de mães infectadas. Vale à pena ressaltar que estamos cientes do aumento

basal da IL-6, TNF- α , (pró-inflamatório); PD-L1 (imunossupressora) e FIZZ (pró-tumor) nos animais do grupo AI. Este background parece estar de acordo com a ação dicotômica do leite materno, que pode levar uma ação estimuladora e ao mesmo tempo tolerogênica (Dawod B., 2019). Esta dualidade sugere que o leite materno contribui simultaneamente para a maturação imunológica e o controle de respostas exacerbadas (Holanda et al., 2020). Então, a depender do contexto da resposta imune, sob ativação celular, há um direcionamento de proteção que pode ser estimulatória ou supressiva.

Em relação aos animais expostos à infecção materna apenas durante a gestação, houve maior expressão de IL-35 e TGF, basal e sob ativação com mitógeno. Então, é possível que estas citocinas estejam envolvidas com o mau prognóstico nesses animais (aumento do peso corpóreo e aumento do tumor). A IL-35 e TGF são conhecidas por suas potentes propriedades imunossupressoras, frequentemente associada à função de células T reguladoras (Tregs) e B reguladoras (Bregs) (Varadé et al., 2021). No contexto do câncer, a IL-35 pode ter um papel dual (Mirlekar B., 2022), mas frequentemente promove a progressão tumoral ao suprimir a resposta imune antitumoral. Durante a gestação, o sistema imunológico materno sofre adaptações que favorecem a tolerância ao feto, como o aumento de células T reguladoras e o predomínio de respostas Th2, que pode comprometer a imunidade contra patógenos (Kumar et al., 2022). De fato, em linfócitos sob ativação celular mitogênica, Holanda et al. 2019 demonstraram que a infecção materna esquistossomótica impacta a programação genética com expressão de desacetilases HDAC 9, envolvida com produção de IL-10 e corroborando Santos et al. 2016 que observaram elevada produção desta citocina nos animais MI. Quando analisadas células T naive, Klar K et al., 2017 mostraram que exposição intrauterina à esquistossomose promoveu reprogramação epigenética marcada por menor acetilação no promotor de IL-4 com maior diferenciação Th1 e redução de Th2. Embora não tenhamos focado em marcadores de Th1 e Th2, estes dados sugerem que sob ativação celular descendentes gerados e portadores do Carcinoma Ehrlich podem não ser protegidos por perfil predominante Th1 e sim desenvolverem um perfil imunossupressor. Diferentemente, os resultados apontam que nos animais CONTROLE-CE o mecanismo supressor pode ser através das moléculas pró-tumor PDL-1 e ARG junto com TGF.

É importante mencionar que a evolução do crescimento tumoral e corpóreo dos animais dos grupos MI-CE e MIAI-CE foram semelhantes, porém neste último não houve aumento da expressão de IL-35 e sim produção de TGF. Isto indica que o fato de ser amamentado, logo após ao nascimento, pode ter suprimido a produção de IL-35. Com

relação à produção de TGF, é possível ser necessária uma ação conjunta do ambiente intrauterino que é rico em TGF (Ma X., 2025), bem como da presença desta citocina no leite materno (Cacho., 2017) e assim impor um maior “*imprint*” da produção de TGF nos animais nascidos e amamentados em mães esquistossomóticas.

2. CONCLUSÃO

Em suma, nossos resultados indicam que a amamentação por mães com esquistossomose confere uma vantagem de sobrevivência à prole portadora do carcinoma de Ehrlich, um efeito possivelmente mediado pelo controle de comorbidades que são associadas ao TNF e IL-6. Não houve manutenção dos níveis basais de IL-6, TNF e PD-L1, sob ativação celular, indicando um equilíbrio de fatores pró- e imunossupressores no contexto da amamentação prévia em mães infectadas. Por outro lado, a exposição durante a gestação induziu IL-35 e TGF que podem corroborar a manutenção do crescimento tumoral. Estudos futuros são necessários para elucidar os mecanismos por trás da proteção conferida pela amamentação, incluindo a identificação dos fatores específicos no leite materno responsáveis por essa modulação e a caracterização mais aprofundada das subpopulações celulares e vias de sinalização envolvidas na resposta antitumoral alterada, particularmente o eixo IL-35.

3. REFERÊNCIAS

- ABDUL-RAHMAN, T. et al. The paradoxical role of cytokines and chemokines at the tumor microenvironment: a comprehensive review. *European Journal of Medical Research*, v. 29, p. 124, 2024.
- Boutillier AJ, ElSawa SF. Macrophage Polarization States in the Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 29;22(13):6995.
- CACHO NT e Lawrence RM (2017) Imunidade Inata e Leite Materno. *Front. Immunol*. 8:584.
- CAO, G. et al. IL-35⁺ induced by pro-resolving macrophages, but not TGF- β 1⁺: regulatory B cell activation requires the PD-L1/PD-1 pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 26, n. 11, p. 5332, 2025.
- CORTÉS-SELVA, D. et al. Maternal schistosomiasis impairs offspring Interleukin-4 production and B cell expansion. *PLoS Pathogens*, v. 17, n. 2, e1009260, 2021.
- CALDITO, N. Role of tumor necrosis factor-alpha in the central nervous system: a focus on autoimmune disorders. *Frontiers in Immunology*, v. 14, 1213448, 2023.
- DAWOD, B.; MARSHALL, J. S. Cytokines and soluble receptors in breast milk as enhancers of oral tolerance development. *Frontiers in Immunology* v. 10, p. 16, 2019.
- EISSA, M.M., Salem, A.E. & El Skhawy, N. Parasites revive hope for cancer therapy. *Eur J Med Res* 29, 489 (2024).
- GUO, Z.; Yu, J.; Chen, Z.; Chen, S.; Wang, L. Immunological Mechanisms behind Anti-PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint Blockade: Intratumoral Reinvigoration or Systemic Induction? *Biomedicines* 2024, 12, 764.
- HOLANDA, G. C. R. et al. Gestation and breastfeeding in schistosomal mice differentially alters the expression of histone deacetylases (HDACs) in adult offspring. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 114, p. 1–10, e190366, 2019.
- HOLANDA, G. C. R. et al. Whey milk proteomics from *Schistosoma mansoni*-infected mice reveals proteins involved in immunomodulation of the offspring. *Parasitology Research*, v. 119, p. 1607–1617, 2020.
- KLAR, K. et al. Chronic schistosomiasis during pregnancy epigenetically reprograms T-cell differentiation in offspring of infected mothers. *European Journal of Immunology*, v. 47, n. 5, p. 841–847, 2017.
- KUMAR, M.; SAADAOUI, M.; AL KHODOR, S. Infections and pregnancy: effects on maternal and child health. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 12, 873253, 2022.
- LI, H. et al. Helminth-induced immune modulation in colorectal cancer: exploring therapeutic applications. *Frontiers in Immunology*, v. 16, 1484686, 2025.
- MIN Y, Wei X, Xia X, Wei Z, Li R, Jin J, Liu Z, Hu X and Peng X (2023) Hepatitis B virus

infection: An insight into the clinical connection and molecular interaction between hepatitis B virus and host extrahepatic cancer risk. *Front. Immunol.* 14:1141956.

MIRLEKAR, B. Tumor promoting roles of IL-10, TGF- β , IL-4, and IL-35: its implications in cancer immunotherapy. *SAGE Open Medicine*, v. 10, 20503121211069012, 2022.

PESCE JT, Ramalingam TR, Mentink-Kane MM, Wilson MS, El Kasmi KC, et al. (2009) Arginase-1-Expressing Macrophages Suppress Th2 Cytokine-Driven Inflammation and Fibrosis. *PLOS Pathogens* 5(4): e1000371

SANTOS, P. E. A. et al. Gestation and breastfeeding in schistosomotic mothers differently modulate the immune response of adult offspring to postnatal *Schistosoma mansoni* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 111, p. 83–92, 2016.

SANTOS, P. E. A. et al. Influence of maternal schistosomiasis on the immunity of adult offspring mice. *Parasitology Research*, v. 107, p. 95–102, 2010.

SILVA, F. L. D. et al. Suckling by *Schistosoma mansoni*-infected mothers restored IgG2a and TGF- β production, but not IL-6 and delayed-type hypersensitivity in IL-12/IL-23-deficient mice. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 54, e0744-2020, 2021.

STRIZOVA, Z. et al. M1/M2 macrophages and their overlaps – myth or reality? *Clinical Science (London)*, v. 137, n. 15, p. 1067–1093, 2023.

Sukocheva OA, Neganova ME, Aleksandrova Y, Burcher JT, Chugunova E, Fan R, Tse E, Sethi G, Bishayee A, Liu J. Signaling controversy and future therapeutical perspectives of targeting sphingolipid network in cancer immune editing and resistance to tumor necrosis factor- α immunotherapy. *Cell Commun Signal.* 2024

VARADÉ, J.; MAGADÁN, S.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, Á. Human immunology and immunotherapy: main achievements and challenges. *Cellular & Molecular Immunology*, v. 18, p. 805–828, 2021.

YULE, M. S. et al. Cancer cachexia: exploring parallels with other paraneoplastic syndromes. *Current Opinion in Supportive and Palliative Care*, 24 abr. 2025. Epub ahead of print.

Wang RX, Yu CR, Dambuza IM, Mahdi RM, Dolinska MB, Sergeev YV, Wingfield PT, Kim SH, Egwuagu CE. Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. *Nat Med.* 2014

ANEXO A - Normas de publicação da revista

Artigos de pesquisa e Revisões Convidadas devem começar com um RESUMO, que aparecerá antes do corpo do texto. Deve ser escrito em um parágrafo com frases completas e resumir os materiais, métodos, resultados e principais conclusões em 250 palavras ou menos, em um formato compreensível para qualquer imunologista e adequado para serviços de resumo. Se forem utilizadas referências em um resumo, elas devem incluir o(s) autor(es), título do periódico, número do volume, página inicial e ano. Abreviações devem ser evitadas em resumos sempre que possível.

A parte principal de um artigo de pesquisa deve começar com uma breve INTRODUÇÃO, que descreva as origens históricas ou lógicas do estudo sem repetir o resumo ou resumir os resultados, uma seção sobre MÉTODOS e uma sobre RESULTADOS, na qual as observações são apresentadas com referência mínima à literatura anterior ou a possíveis interpretações. Estas devem ser incluídas na seção final de DISCUSSÃO, que pode começar com um breve resumo dos principais achados, mas a repetição de partes da seção de resultados deve ser evitada.

Os nomes e locais dos fornecedores (cidade e país) devem ser fornecidos para quaisquer reagentes/equipamentos utilizados.

Nos casos em que for útil, por favor, expanda ou explique quaisquer abreviações, por exemplo, "...forkhead box P3 (FOXP3)" ou "...the transcription factor FOXP3", na primeira utilização no Resumo e novamente no texto principal. Geralmente, não abrevie palavras isoladas (por exemplo, anticorpo, antígeno, imunoglobulina, interferon, interleucina), a menos que sejam partes de frases mais longas ou descrevam moléculas específicas (por exemplo, mAb, complexo Ab–Ag; IgG, IFN- α , IL-1 α). Subconjuntos específicos de células T auxiliares podem ser designados como células Th1, células Tfh, etc.; células T reguladoras podem ser designadas como células Treg. Símbolos de genes (por exemplo, IL1A em humanos ou Il1a para camundongos) não precisam ser definidos, mas devem estar em itálico; o produto proteico, interleucina 1 α (IL-1 α), deve estar em fonte romana. Um recurso útil para símbolos de genes padronizados é o banco de dados HUGO [GeneNames].

Declaração de conflitos de interesse. Deve ser incluída uma declaração que detalhe quaisquer conflitos de interesse ou declare que não há nenhum.

Financiamento. Detalhes de todas as fontes de financiamento, incluindo os números específicos de subsídios, para o trabalho em questão devem ser fornecidos em uma seção separada intitulada "Financiamento". Esta seção deve aparecer antes da seção "Agradecimentos".